

基于转录组测序的黄麻 SSR 分子标记开发与初步验证

陶爱芬 陈婉婷 祁建民* 徐建堂 林荔辉 林培清 张立武 方平平*

(福建农林大学 教育部作物遗传育种与综合利用重点实验室/福建省分子设计育种实验室,福州 350002)

摘要 为开发黄麻 SSR 引物,为黄麻分子标记辅助育种等研究提供有利工具,在黄麻转录组测序的基础上,采用 MicroSATellite (MISA) 软件进行 SSRs 搜索,并对部分 SSR 引物的多态性进行验证,结果表明:1) 在 1 kb 以上的 13 718 条 unigene 中,共检测到 8 571 个 SSR 位点,占评估序列数目的 62.47%,平均每 3.47 kb 有 1 个 SSR;2) 所开发的 SSR 标记中,单核苷酸重复序列最多,占 42.15%,二核苷酸和三核苷酸序列也较丰富,分别占 14.80% 和 16.74%;3) 利用 Primer3.0 软件设计与木质素合成酶基因及 MYB 转录因子相关的 880 对引物,随机选取 29 对引物,以 8 份不同类型黄麻种质进行多态性验证,获得 8 对具有稳定多态性的引物,多态性引物比率为 27.58%。结果表明,基于黄麻转录组序列的 SSR 标记开发是可行的,开发的 SSR 标记可为黄麻属遗传多样性分析、遗传图谱构建及功能基因的挖掘等研究提供有利工具。

关键词 黄麻; 转录组; SSR 分子标记; 开发

中图分类号 S563.4

文章编号 1007-4333(2018)06-0024-09

文献标志码 A

Development and identification of SSR molecular markers based on transcriptome sequences of jute (*Corchorus Capsularis* L.)

TAO Aifen, CHEN Wanting, QI Jianmin*, XU Jiantang, LIN Lihui,

LIN Peiqing, ZHANG Liwu, FANG Pingping*

(Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops/

Fujian provincial Key Laboratory of Crops by Design, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract In order to develop SSR markers and provide powerful tools for the molecular marker-assisted breeding of jute, the SSR loci from transcriptome sequences were searched by MicroSATellite (MISA) software, and the polymorphism of some SSRs were identified. The result showed that: 1) A total of 8 571 locus, which were longer than 1 kb and accounted for 62.47% of the screened Unigenes, were identified from 13 718 Unigenes, resulting in one SSR per 3.47 kb on average; 2) Mononucleotide repeat was the most abundant repeat type, accounting for 42.15% of the total number of SSRs. The dinucleotide and trinucleotide repeat were less abundant, which ratio was 14.80% and 16.74%, respectively; 3) A total of 880 primers related to lignin synthase gene and MYB transcription factor were designed by Primer 3.0, among which 29 were screened and 8 pairs of primers produced polymorphic bands. The ratio of polymorphic primers was 27.58%. In conclusion, it is feasible to develop SSR molecular markers based on transcriptome sequencing analysis of jute, which could be applied for analyzing genetic diversity, genetic linkage mapping and functional gene mining of jute.

Keywords *Corchorus Capsularis* L.; transcriptome sequences; SSR molecular markers; development

收稿日期: 2017-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471549); 现代农业产业技术体系建设项目(CARS-19-E06)

第一作者: 陶爱芬, 副研究员, 主要从事麻类作物遗传育种研究, E-mail: 281770126@qq.com

通讯作者: 祁建民, 教授, 主要从事麻类作物遗传育种研究, E-mail: qijm863@163.com

方平平, 副教授, 主要从事麻类作物遗传育种研究, E-mail: fangpp1990@qq.com

黄麻 (*Corchorus* sp.) 是椴树科 (Tiliaceae) 黄麻属 (*Corchorus*) 一年生草本韧皮纤维植物, 纤维具有细软、强力大、吸湿性好、散水快和可纺性好等特点, 在现代服装产业、造纸业和复合材料等领域得到了广泛应用, 其种植量和用途的广泛性仅次于棉花^[1-2]。

简单重复序列 (Simple sequence repeat, SSR), 是广泛存在于动植物基因组中的 1~6 个核苷酸串联重复单元^[3-4]。相对于其他标记而言, SSR 标记具有多态性好、重复性高和覆盖面积广等优点, 在作物遗传关系分析、基因定位和分子标记辅助育种等方面得到了广泛应用^[5-7]。但传统微卫星标记开发存在实验过程繁杂、费时费力和成功概率较低等缺点^[8-9]。另外, 虽然表达序列标签 (Expressed Sequence Tag, EST) 在公共数据库中的数据量与日俱增, 但相对于转录组来说数据量相对缺乏, 特别是在非模式植物中更为突出^[10]。随着测序技术的飞速发展, 转录组研究在许多非模式生物中得到广泛的应用^[11-13], 而基于转录组开发的分子标记较其他标

记具有信息量大和通用性好的特点^[14], 在矫正物种遗传连锁图谱和比较作图方面具有较强的优势^[15]。

SSR 分子标记的开发, 对于黄麻高密度遗传连锁图谱构建、重要性状的基因定位和遗传机制剖析等研究具有重要意义^[16-18]。然而, 与其他作物相比, 黄麻 SSR 分子标记开发工作相对落后, 研究还不够深入^[19-20], 目前基于黄麻属转录组测序的 SSR 分子标记开发的研究尚未见报道。本研究通过对黄麻属转录组数据进行系统分析, 挖掘和分析 SSR 位点, 在 RNA 水平上揭示黄麻属 SSR 位点的规律和特征, 并对其多态性进行初步验证, 旨在为黄麻种质资源遗传多样性研究、基因定位以及分子辅助育种提供分子水平上的有效工具。

1 材料与方法

1.1 植物材料与 DNA 提取

采用 8 份黄麻种质进行 SSR 引物有效性验证和多态性筛选 (表 1), 通过改良的 CTAB 法进行 DNA 提取^[21]。

表 1 用于引物筛选的黄麻种质

Table 1 Accessions of jute used for SSR markers screening

编号 Code	种 Species	品种 Variety
1	圆果种 <i>Capsularis</i> L.	黄麻 179 Jute 179
2		云野 I-1 YunyeI-1
3		紫苏麻 Zisuma
4		板八黄麻 Banba Huangma
5	长果种 <i>Olitorus</i> L.	巴麻 4 号 Bama No. 4
6		西贡长荚 Xigong Changjia
7		马里 807 Mali 807
8		巴麻 71 Bama No. 71

1.2 转录组数据来源

用于测序的黄麻材料为黄麻 179, 种植于福建农林大学校内, 待株高为 20 cm 时, 取幼苗全株, 迅速置于液氮中。提取 RNA 后, 构建测序文库, 用 Illumina HiSeq4000 进行高通量测序, 测序读长为 PE150。对原始测序数据进行过滤后采用 Trinity 软件对经过过滤的高质量数据进行组装^[11], 共获得 72 674 条 Unigene。

1.3 转录组 SSR 位点筛选

利用 MISA 软件 ([http://pgrc.ipkgatersleben.](http://pgrc.ipkgatersleben.de/misa)

[de/misa](http://pgrc.ipkgatersleben.de/misa)) 对黄麻转录组测序组装后获得的 1 kb 以上的 Unigene 做 SSR 位点筛选和分析。其中筛选标准参数设置为: 重复基元为 1~6 bp, 其中一、二、三、四、五和六核苷酸基元最小重复次数分别为 10、6、4、4、4 和 4。

1.4 SSR 引物设计及验证

利用 Primer 3.0 进行引物批量设计, 设置参数为: 引物长度为 18~25 bp, PCR 预期扩增产物大小在 100~500 bp, 退火温度 (T_m) 在 55~64 °C, 上、下游引物的 T_m 值相差 ≤ 5 °C, GC 含量在 40%~

60%。从中挑选 29 对与木质素合成和 MYB 转录因子相关的引物(表 2),由厦门泰京生物技术有限公司进行合成,按照本实验室报道的方法进行

PCR 扩增^[22],采用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。用 DPS 软件绘制基于 UPGMA 法的树状聚类图。

表 2 29 对 SSR 引物的信息

Table 2 Information of 29 pairs of SSR primers

引物名称 Primer name	正向引物序列 Forward primer (5'-3')	反向引物序列 Reverse primer (5'-3')
<i>ACL SSR1</i>	GCCTTTGAATTTGATGATTTCC	ACCTTGATGGTTGGCTTCAC
<i>ACL SSR2</i>	GCCTTTGAATTTGATGATTTCC	GATCCTGAAACTGGCTGCTC
<i>ACL SSR3</i>	GCCTTTGAATTTGATGATTTCC	CAGGATCATGTGGGACTGTG
<i>Coo SSR1</i>	CCTGAGTTGGAGCCATTGAT	GGGGAGCAGCAAATTAACAT
<i>Coo SSR2</i>	CTGAGCTCTTTCATGGCCTC	GGGGAGCAGCAAATTAACAT
<i>Coo SSR3</i>	GAGCTCTTTCATGGCCTCAG	GGGGAGCAGCAAATTAACAT
<i>COMTSSR1-1</i>	GACAAAGCCCTAACCTGTGC	GGCCGAAATTCAAGATGAAA
<i>COMTSSR1-2</i>	GACATGCTTTGGTTGCCATA	GGCCGAAATTCAAGATGAAA
<i>COMTSSR1-3</i>	GACAAAGCCCTAACCTGTGC	CTCATATCCAGAACGCTGGG
<i>COMTSSR2-1</i>	TGTGTTGCCCAAATAAATGAA	CGAAGATGGAGTTGCAAGGT
<i>COMTSSR2-2</i>	TGTGTTGCCCAAATAAATGAAA	CGAAGATGGAGTTGCAAGGT
<i>COMTSSR2-3</i>	GATGTGTTGCCCAAATAAATGA	CGAAGATGGAGTTGCAAGGT
<i>COMTSSR3-1</i>	TGAAAATGGAAATTACAAAGAAAA	CCCGAAAACAATATGAAGCC
<i>COMTSSR3-2</i>	TGAAAATGGAAATTACAAAGAAAA	CCCGAAAACAATATGAAGCC
<i>COMTSSR3-3</i>	TGAAAATGGAAATTACAAAGAAA	CCCGAAAACAATATGAAGCC
<i>MYB SSR1-1</i>	AGCTCCTCCTCCACCATTCT	GGTGAAGAGTTGGGTTCCCT
<i>MYB SSR1-2</i>	TGTGCAGATTTGCTCCATCT	TGGAGGAAGATTTTCCGATG
<i>MYB SSR1-3</i>	TTCTTTCTTTTATCAGAATCCCAA	GAGAGTTCTGCAGGCCAAGT
<i>MYB SSR1-4</i>	CCATGGACCTTTGATTCGAT	TCCCTTCCCATTCTCTTCCCT
<i>MYB SSR1-5</i>	ACCCACTTGATTGCTTCACC	GAGAAAGAGAGGTTTGGGGG
<i>MYB SSR2-1</i>	TGACTGCCACTGCTATCTG	TCATGGGAAACTGCAACAAA
<i>MYB SSR2-2</i>	TGTGCAGATTTGCTCCATCT	AGACGTTTCCAAATGATCCG
<i>MYB SSR2-3</i>	TTCTTTCTTTTATCAGAATCCCAA	GAGAGTTCTGCAGGCCAAGT
<i>MYB SSR2-4</i>	AGATGGATGGGATGACTGGA	TTACGGCCACACCATATTCA
<i>MYB SSR2-5</i>	CCTGGCATTGGTAGAAGCAT	GCCGTGATAAGGTTTCTGGA
<i>MYB SSR3-1</i>	TGTGCAGATTTGCTCCATCT	CCAAATGATCCGTCGATTCT
<i>MYB SSR3-3</i>	TGACTGCCACTGCTATCTG	TTTCATGGGAAACTGCAACA
<i>MYB SSR3-4</i>	AAGATGGATGGGATGACTGG	AAAGCAACTGCAATTACGGC
<i>MYB SSR3-5</i>	CCTGGCATTGGTAGAAGCAT	AACAGCAGCCGTGATAAAGGT

注:表中加粗的部分为多态性理想的 SSR 引物。

Note: The primers in bold are polymorphic primers.

2 结果与分析

2.1 黄麻转录组中 SSR 位点的数量与分布

黄麻转录组经组装后共获得 72 674 条 unigene 序列, 利用 MISA 软件对 1 kb 以上的 Unigene 做 SSR 分析, 结果见表 3。评估的序列总数目为 13 718 条, 序列总长度为 29 705 997 bp,

检测到的 SSR 位点总数为 8 571 个, 占所评估序列总数目的 62.48%, 平均每 3.47 kb 有 1 个 SSR 位点。由表 3 可知, 共有 5 722 条 unigene 序列包含 SSR 位点, 占评估序列总数的 41.71%。其中 1 950 条 unigene 序列含有 1 个以上 SSR 位点, 而含复合型 SSR 位点的 unigene 序列有 757 条。

表 3 黄麻转录组中 SSR 位点的搜索结果

Table 3 SSR search results in transcriptome of *Corchorus capsularis* L.

项目 Item	数量 Number
搜索序列总数目 Number of searching sequences	13 718
搜索序列总长度/bp Length of searching sequences	29 705 997
识别的 SSR 总数 Number of total SSR	8 571
包含 SSR 的序列数目 Number of sequences with SSRs	5 722
包含 1 个以上 SSR 的序列数目 Number of sequences with more than one SSRs	1 950
包含复合型 SSR 的序列数目 Number of sequences with composite SSR	757

2.2 黄麻转录组中 SSR 基序类型和频率特征

SSR 基序类型和分布见表 4。由表 4 可知, 单核苷酸重复 SSR 到六核苷酸重复 SSR 在黄麻属均有分布。其中单核苷酸重复 SSR 数目最多, 达 5 782 个, 占 SSR 位点总数的 67.46%; 双核苷酸和三核苷酸 SSR 数量亦较丰富, 分别为 1 269 和 1 435 个, 占 SSR 位点总数的 14.81% 和 16.74%; 而四核苷酸至六核苷酸重复 SSR 数目非常少, 三者的总和为 85 个, 其中五核苷酸重复序列最少, 仅为 10 个。而各种核苷酸基序均有其优势重复基序(表 5), 从表 5 可以看出, 单核苷酸的优势重复基序为 A/T, 在单核苷酸重复中所占比例为 99.10%。二核苷酸的优势重复基序为 AG/CT、AT/AT, 在二核苷酸重复中所占比例为 94.56%。三核苷酸重复基序以

AAG/CTT 为主, 而 ATC/ATG、AGC/CTG 和 AAT/ATT 数量亦较丰富。

2.3 黄麻 SSR 不同基序重复次数分布

黄麻 SSR 重复基序的重复次数分布情况见表 6。黄麻中 SSR 基序的重复次数主要分布在 5~24 次。由表 6 可知, 低重复次数(5~9 次重复)的 SSR 位点有 2 611 个, 占总数的 30.46%; 中等重复次数(10~11 次重复)的 SSR 位点数目最多, 有 3 484 个, 占总数的 40.65%; 而 >11 次重复的 SSR 位点有 2 476 个, 占总数的 28.89%。其中单核苷酸基序重复次数均 ≥ 10 , 重复 11 次以上的最多, 占 42.74%; 而二核苷酸基序以中低重复次数为主, 占 95.27%; 三核苷酸至六核苷酸基序重复次数则全部 ≤ 9 。

表4 黄麻转录组中 SSR 各基序类型分布情况

Table 4 Distribution of the SSR motifs in *Corchorus capsularis* L. transcriptome

重复类型 Type of SSR	SSR 数目 Number	所占比例/% The ratio of total SSRs	出现频率/% Frequency
单核苷酸重复 SSR Mononucleotide SSR	5 782	67.46	42.15
二核苷酸重复 SSR Dinucleotide SSR	1 269	14.80	9.25
三核苷酸重复 SSR Trinucleotide SSR	1 435	16.74	10.46
四核苷酸重复 SSR Tetranucleotide SSR	64	0.74	0.46
五核苷酸重复 SSR Pentanucleotide SSR	10	0.12	0.07
六核苷酸重复 SSR Hexanucleotide SSR	11	0.13	0.08
总计 Total	8 571	100	62.47

表5 黄麻转录组中 SSR 重复基序的类型及数量

Table 5 The type and number of different SSR motifs in *Corchorus capsularis* L. transcriptome

重复类型 Type of SSR	主要重复基序 Main repeat motifs	数量 Number
单核苷酸 Mononucleotide	A/T	5 730
	C/G	52
二核苷酸 Dinucleotide	AC/GT	69
	AG/CT	684
	AT/AT	516
	AAC/GTT	88
三核苷酸 Trinucleotide	AAG/CTT	509
	AAT/ATT	142
	ACC/GGT	101
	ACG/CGT	20
	ACT/AGT	30
	AGC/CTG	162
	AGG/CCT	10
	ATC/ATG	209
四核苷酸 Tetranucleotide	CCG/CGG	64
	AAAG/CTTT	15
	AAAC/GTTT	4
	AAAT/ATTT	15
	AATG/ATTG	5
	AATC/ATTG	3
	ACAG/CTGT	6

表 6 黄麻转录组中 SSR 重复次数分布

Table 6 Repeat numbers of SSRs in *Corchorus capsularis* L. transcriptome

重复类型 Type of SSR	重复次数 Repeat number								总计 Total	比例/% Ratio
	5	6	7	8	9	10	11	>11		
单核苷酸 Mononucleotide	—	—	—	—	—	2 260	1 051	2 471	5 782	42.15
二核苷酸 Dinucleotide	—	523	275	169	124	118	55	5	1 269	9.25
三核苷酸 Trinucleotide	893	368	158	15	1	0	0	0	1 435	10.46
四核苷酸 Tetranucleotide	58	4	2	0	0	0	0	0	64	0.46
五核苷酸 Pentanucleotide	8	1	1	0	0	0	0	0	10	0.07
六核苷酸 Hexanucleotide	4	5	1	0	1	0	0	0	11	0.08
总计 Total	963	901	437	184	126	2 378	1 106	2 476	8 571	62.47
比例/% Ratio	11.23	10.51	5.09	2.15	1.47	27.74	12.90	28.88	100	

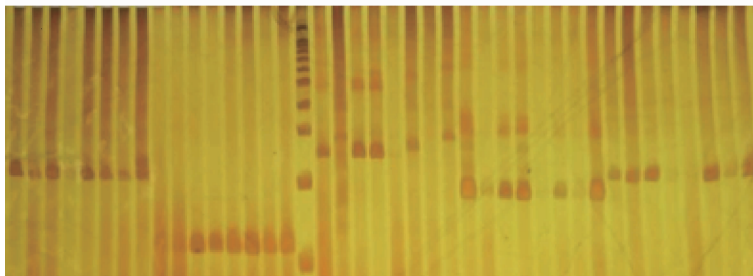
2.4 黄麻转录组 SSR 引物有效性初步验证

以黄麻 179 等 8 份不同黄麻种质基因组 DNA 为模板, 针对 29 对 SSR 引物的有效性进行验证 (图 1), 共筛选得到 8 对多态性理想的 SSR 引物 (表 2 中黑体字部分), 分别为 *COMTSSR1-1*、*COMTSSR2-2*、*COMTSSR2-3*、*MYBSSR2-1*、*MYBSSR2-5*、*MYBSSR3-1*、*MYBSSR3-3*、*MYBSSR3-5*, 多态性

引物比率为 27.58%。8 对 SSR 引物中, 有 3 对与木质素合成酶基因 *COMT* 相关, 5 对与 *MYB* 转录因子相关, 可用于后续性状鉴定、基因定位和分子标记辅助育种等研究。

另外, 聚类分析结果表明, 8 对 SSR 引物可将 8 份黄麻材料按物种类型区别开来 (图 2), 即圆果种黄麻和长果种黄麻分别聚为一类, 其中野生圆果类

MYBSSR2-3 *MYBSSR2-4* M *MYBSSR2-5* *MYBSSR2-1* *MYBSSR3-3*
1 2 3 4 5 6 7 8 1 2 3 4 5 6 7 8 1 2 3 4 5 6 7 8 1 2 3 4 5 6 7 8 1 2 3 4 5 6 7 8

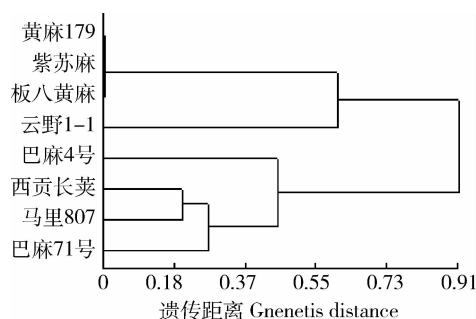


M: Maker; 1: 黄麻 179; 2: 云野 I-1; 3: 紫苏麻; 4: 板八黄麻; 5: 巴麻 4 号; 6: 西贡长荚; 7: 马里 807; 8: 巴麻 71; *COMTSSR*: 与木质素合成酶基因 *COMT* 相关的 SSR 引物; *MYBSSR*: 与 *MYB* 转录因子相关的 SSR 引物

M: Maker; 1: Jute 179; 2: YunyeI-1; 3: Zisuma; 4: Banba Huangma; 5: Bama No. 4; 6: Xigong Changjia; 7: Mali 807; 8: Bama No. 71. *COMTSSR*: SSR primers related with the lignin synthase gene *COMT*. *MYBSSR*: SSR primers related with transcription factor *MYB*.

图 1 部分 SSR 标记的扩增结果

Fig. 1 Amplification results of part SSR primers in 8 jute accessions



品种名称:黄麻 179,紫苏麻,板八黄麻,云野 I-1,巴麻 4 号,西贡长莢,马里 807,巴麻 71

Accession names:Jute 179,Zisuma,Banba Huangma,Yunye I-1,Bama No. 4,Xigong Changjia,Mali 807,Bama No. 71

图 2 8 份黄麻材料的 UPGMA 树状聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 8 jute accessions based on UPGMA

型黄麻云野 I-1 又自成一类。以上结果说明这 8 对 SSR 引物可以用于黄麻属遗传多样性分析和亲缘关系研究,同时表明基于黄麻转录组序列的 SSR 标记开发是可行的。

3 讨论

转录组测序不依赖于物种的全基因组信息,能够快速 and 准确地获得物种全转录本序列信息^[23]。近年来,随着新一代测序技术的发展,基于转录组数据的 SSR 开发已经被广泛应用到茶树、蔬菜、果树及中草药等研究中^[24-27]。与传统 SSR 标记方法相比,基于转录组的 SSR 分析表现出了操作简便、省时省力和成功率高等优势^[23]。

本研究表明,黄麻转录组中 1 kb 以上的 Unigene 中 SSR 位点出现频率为 62.47%,SSR 总检出率为 11.79%,高于桉木^[28](9.67%)、菠菜^[25](4.43%)和红豆杉^[10](2.24%),但低于连翘^[27](25.15%),表明黄麻转录组中 SSR 位点数量相对丰富,而且出现频率较高。黄麻 SSR 位点在评估序列中平均分布距离为 3.47 kb,远高于枇杷^[29](11.24 kb)、刺梨^[30](14.56 kb)、核桃^[31](9.34 kb),与楠木^[23]相当(3.37 kb)。这可能是由于不同物种间基因组本身的差异性引起的,也可能是因为 SSR 位点鉴别时设置的参数不同导致的^[9]。本研究只对黄麻转录组中 1 kb 以上的 Unigene 进行 SSR 位点分析,这也是黄麻 SSR 位点平均分布距离较小的原因之一。另外,从 SSR 重复基序种类来看,黄麻转录组中 SSR 位点包含多种重复基序,一至六核苷酸均存在。其中出现频率 42.15%的单核苷酸为主,

其次为频率 14.81%的二核苷酸和 16.74%的三核苷酸,这与西葫芦 SSR 的重复基序分布情况一致^[32]。前人研究表明,多数植物 SSR 标记重复基序类型以二、三核苷酸重复为主^[33],但也不尽相同,如南方红豆杉中 SSR 重复基序以六核苷酸重复为主,可见不同物种之间存在差异,这应该是物种之间的特异性引起的,也可能与不同的自然选择机制有关^[10,25]。同时,黄麻 SSR 中的单核苷酸的优势重复基序为 A/T,二核苷酸的优势重复基序为 AG/CT,三核苷酸重复基序以 AAG/CTT 居多,这与前人在其他作物上的研究结果一致^[34]。

另外,本研究对 29 对 SSR 引物的有效性进行了验证,结果表明,这些 SSR 引物均能扩增出条带,但部分引物的扩增条带与预期大小不符,同时亦存在多扩增条带的情况。前人研究表明,这是研究物种转录组 SSR 或者 EST-SSR 时常见的问题,这类引物亦为有效引物^[10]。同时,本试验筛选得到 8 对多态性理想的 SSR 引物,多态性引物比率为 27.58%,与西葫芦的 26.53%相当^[32],高于菠菜^[25](17.43%)和楠木^[23](18%),低于连翘^[27](30%)和南方红豆杉^[10](38.71%)。可见,基于转录组数据开发的 SSR 引物的多态性比率在不同物种间存在较大差异,这可能与不同物种的 DNA 转录序列的保守性有关^[35]。Das 等^[19]对在文库构建基础上开发的 374 对黄麻 SSR 引物进行了筛选,获得 66 对多态性理想的引物,多态性引物的比率为 17.65%,低于本研究的 27.58%。Ghosh 等^[17]从 88 对黄麻 SSR 引物中得到 22 对多态性引物,占所用引物的 25%,比本研究的结果稍低。而张立武等^[20]在黄麻 EST 序列的基础上,开发了 66 对 SSR 引物,其中 42 对为多态性引物,多态性引物比率高达 63.6%,这可能与其用来进行引物筛选的材料中包含黄麻近缘野生种和野生种等不同的种有关。而前人研究亦表明,SSR 的多态性和所用材料数量及材料之间差异程度有关^[25]。

4 小结

本研究结果表明利用黄麻转录组数据开发 SSR 标记的可行性,同时这些标记的开发丰富了黄麻分子标记的数量,为黄麻种质资源遗传多样性分析、分子标记辅助育种、遗传图谱构建和功能基因的挖掘等提供了有利工具。

参考文献 References

- [1] 熊和平. 麻类作物育种学[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 156-185
- Xiong H P. *Breeding of Bast Fiber Crops*[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2008: 156-185 (in Chinese)
- [2] 陶爱芬, 祁建民, 李木兰, 方平平, 林荔辉, 徐建堂. SRAP 结合 ISSR 方法分析黄麻属的起源与演化[J]. 中国农业科学, 2012, 45(1): 16-25
- Tao A F, Qi J M, Li M L, Fang P P, Lin L H, Xu J T. Origin and evolution of jute analyzed by SRAP and ISSR methods[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(1): 16-25 (in Chinese)
- [3] Kalia R K, Rai M K, Kalia S, Singh R, Dhawan A K. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants[J]. *Euphytica*, 2011, 177(3): 309-334
- [4] 程小毛, 黄晓霞. SSR 标记开发及其在植物中的应用[J]. 中国农学通报, 2011, 27(5): 304-307
- Cheng X M, Huang X X. Development and application of SSR Markers in plants[J]. *Chinese Agriculture Science Bulletin*, 2011, 27(5): 304-307 (in Chinese)
- [5] Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences [J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(4): 617-631
- [6] 李翠婷, 张广辉, 马春花, 孟珍贵, 陈军文, 杨生超. 野三七转录组中 SSR 位点信息分析及其多态性研究[J]. 中草药, 2014, 45(10): 1468-1472
- Li C T, Zhang G H, Ma C H, Meng Z G, Chen J W, Yang S C. Analysis on SSR loci information in transcriptome of *Panax vietnamensis* var *fuscidiscus* and its polymorphism[J]. *Chinese Traditional & Herbal Drugs*, 2014, 45(10): 1468-1472 (in Chinese)
- [7] Lu C, Zou C, Zhang Y, Yu D, Cheng H, Jiang P, Guo X. Development of chromosome-specific markers with high polymorphism for all tetraploid cotton based on genome-wide characterization of simple sequence repeats in diploid cottons (*Gossypium arboreum* L and *Gossypium raimondii* Ulbrich) [J]. *BMC genomics*, 2015, 16(1): 55
- [8] 李齐发, 赵兴波, 罗晓林, 姚平, 李宁, 田志华, 吴常信, 谢庄. 牦牛基因组微卫星富集文库的构建与分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(5): 489-494
- Li Q F, Zhao X B, Luo X L, Yao P, Li N, Tian Z H, Wu C X, Xie Z. Construction and identification on enriched microsatellite library from Yak genome[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(5): 489-494 (in Chinese)
- [9] Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications [J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(1): 48-55
- [10] 李炎林, 杨星星, 张家银, 黄三文, 熊兴耀. 南方红豆杉转录组 SSR 挖掘及分子标记的研究[J]. 园艺学报, 2014, 41(4): 735-745
- Li Y L, Yang X X, Zhang J Y, Huang S W, Xiong X Y. Studies on SSR molecular markers based on transcriptome of *Taxus chinensis* var *mairei*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(4): 735-745 (in Chinese)
- [11] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, Levin J Z, Thompson D A, Amit I, Chen Z. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. *Nature biotechnology*, 2011, 29(7): 644-652
- [12] Franssen S U, Shrestha, R P, Bräutigam A, Bornberg-Bauer E, Weber A P. Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex *Pisum sativum* genome using next generation sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 227
- [13] 黄海燕, 杜红岩, 乌云塔娜, 刘攀峰. 基于杜仲转录组序列的 SSR 分子标记的开发[J]. 林业科学, 2013, 49(5): 176-181
- Huang H Y, Du H Y, Wuyun T N, Liu P F. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Eucommia ulmoides*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2013, 49(5): 176-181 (in Chinese)
- [14] 贾昌路, 张瑶, 朱玲, 张锐. 转录组测序技术在生物测序中的应用研究进展[J]. 分子植物育种, 2015, 13(10): 388-394
- Jia C L, Zhang Y, Zhu L, Zhang R. Application progress of transcriptome sequencing technology in biological sequencing [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(10): 388-394 (in Chinese)
- [15] 李小白, 向林, 罗洁, 胡标林, 田胜平, 谢鸣, 孙崇波. 转录组测序 (RNA-seq) 策略及其数据在分子标记开发上的应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(5): 720-726+740
- Li X B, Xiang L, Luo J, Hu B L, Tian S P, Xie M, Sun C B. The strategy of RNA-seq, application and development of molecular marker derived from RNA-seq [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2013, 35(5): 720-726 (in Chinese)
- [16] Huq S, Islam M S, Sajib A A, Ashraf N, Khan H. Genetic diversity and relationships in jute (*Corchorus* spp) revealed by SSR markers [J]. *Bangladesh Journal of Botany*, 2009, 38(2): 153-161
- [17] Ghosh A, Sharmin S, Islam S, Pahloan M U, Islam S, Khan H. SSR markers linked to mite (Polyphagotarsonemus latus Banks) resistance in jute (*Corchorus olitorius* L) [J]. *Czech Journal of Genet Plant Breed*, 2010, 46(2): 64-74
- [18] 巫桂芬, 徐鲜均, 徐建堂, 陶爱芬, 张立武, 魏丽真, 潘漠, 方平平, 林荔辉, 祁建民. 利用 SRAP, ISSR, SSR 标记绘制黄麻基因源分子指纹图谱[J]. 作物学报, 2015, 41(3): 367-377
- Wu G F, Xu X J, Xu J T, Tao A F, Zhang L W, Wei L Z, Pan M, Fang P P, Lin L H, Qi J M. Construction of molecular fingerprinting map in gene pool of jute with SRAP, ISSR and SSR Markers[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, 41(3): 367-377 (in Chinese)
- [19] Das M, Banerjee S, Dhariwal R, Vyas S, Mir R R, Topdar N, Sinha M K. Development of SSR markers and construction of a linkage map in jute[J]. *Journal of genetics*, 2012, 91(1): 1-11

- [20] 张立武,袁民航,何雄威,刘星,方平平,林荔辉,陶爱芬,徐建堂,祁建民. GenBank 数据库中黄麻 EST-SSR 标记的开发及其通用性评价[J]. 作物学报, 2014, 40(7): 1213-1219
Zhang L W, Yuan M H, He X W, Liu X, Fang P P, Lin L H, Tao A F, Xu J T, Qi J M. Development and universality evaluation of EST-SSR markers from GenBank in Jute[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40 (7): 1213-1219 (in Chinese)
- [21] 陈燕萍,陈美霞,徐建堂,陈晖,陶爱芬,祁建民. 圆果黄麻成熟叶片总 DNA 提取及 SRAP 扩增体系的建立与优化[J]. 福建农林大学学报:自然科学版, 2011, 40(5): 461-466
Chen Y P, Chen M X, Xu J T, Chen H, Tao A F, Qi J M. Extraction of genomic DNA from adult jute leaves, and establishment and optimization of SRAP reaction system[J]. *Journal of Fujian Agriculture & Forestry University*, 2011, 40(5): 461-466 (in Chinese)
- [22] 陶爱芬,谢丽丽,祁建民,方平平,林荔辉,徐建堂,张立武,林培清. 与黄麻炭疽病抗性相关的 SSR 分子标记筛选及新型 SNP 标记开发[J]. 福建农林大学学报:自然科学版, 2017, 46(1): 27-33
Tao A F, Xie L L, Qi J M, Fang P P, Lin L H, Xu J T, Zhang L W, Lin P Q. Screening of SSR markers and developing of newly SNP markers associated with anthracnose resistance in *C. capsularis* [J]. *Journal of Fujian Agriculture & Forestry University*, 2017, 46(1): 27-33 (in Chinese)
- [23] 时小东,朱学慧,盛玉珍,庄国庆,陈放. 基于转录组序列的楠木 SSR 分子标记开发[J]. 林业科学, 2016, 52(11): 71-78
Shi X D, Zhu X H, Sheng Y Z, Zhuang G Q, Chen F. Development of SSR markers based on transcriptome sequence of *Phoebe zhennan* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2016, 52(11): 71-78 (in Chinese)
- [24] 王丽鸳. 基于 EST 数据库和转录组测序的茶树 DNA 分子标记开发与应用研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2011
Wang L Y. Mining and application of molecular markers from EST database and transcriptome sequencing in tea plant (*Camellia sinensis*) [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011 (in Chinese)
- [25] 潜宗伟,陈海丽,崔彦玲. 菠菜转录组 SSR 位点分析及其分子标记的开发[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(11): 1688-1697
Qian Z W, Chen H L, Cui Y L. Analysis of the SSR loci and development of molecular markers in *Spinacia oleracea* transcriptome[J]. *Journal of Agriculture Biotechnology*, 2016, 24(11): 1688-1697 (in Chinese)
- [26] 罗纯,武红霞,姚全胜,王松标,许文天,马小卫. 芒果转录组中 SSR 位点信息分析与引物筛选[J]. 热带作物学报, 2015, 36(7): 1261-1266
Luo C, Wu H X, Yao Q S, Wang S B, Xu W T, Ma X W. Data mining and primer screening of simple sequence repeats in mango transcriptome[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36(7): 1261-1266 (in Chinese)
- [27] 王兴春,谭河林,陈钊,孟灵芝,王文斌,范圣此. 基于 RNA-seq 技术的连翘转录组组装与分析及 SSR 分子标记的开发[J]. 中国科学:生命科学, 2015, 45(3): 301-310
Wang X C, Tan H L, Chen Z, Meng L Z, Fan S C. Assembly and characterization of the transcriptome and development of SSR markers in *Forsythia suspensa* based on RNA-Seq technology[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2015, 45(3): 301-310 (in Chinese)
- [28] 饶龙兵,杨汉波,郭洪英,段红平,陈益泰. 基于桉木属转录组测序的 SSR 分子标记的开发[J]. 林业科学研究, 2016, 29(6): 875-882
Rao L B, Yang H B, Guo H Y, Duan H P, Chen Y T. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequences of *Alnus* [J]. *Forest Research*, 2016, 29(6): 875-882 (in Chinese)
- [29] 郑婷婷,魏伟淋,杨向晖,林顺权. 基于枇杷转录组序列的 SSR 分子标记引物开发[J]. 亚热带植物科学, 2015, 44(4): 274-278
Zheng T T, Wei W L, Yang X H, Lin S Q. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Eriobotrya japonica* [J]. *Subtropical Plant Science*, 2015, 44(4): 274-278 (in Chinese)
- [30] 鄢秀芹,鲁敏,安华明. 刺梨转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发[J]. 园艺学报, 2015, 42(2): 341-349
Yan X Q, Lu M, An H M. Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Rosa roxburghii* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(2): 341-349 (in Chinese)
- [31] 尹燕飞. 核桃(*Juglans regia* L) SSR 开发及其应用[D]. 泰安:山东农业大学, 2015
Yin Y F. Development and application of SSR markers in *Juglans regia* [D]. Tai'an: Shandong Agriculture University, 2015 (in Chinese)
- [32] 张宏亮. 低温胁迫下西葫芦转录组分析与 SSR 分子标记开发[D]. 太原:山西农业大学, 2015
Zhang H L. Transcription analysis of summer squash in response to cold stress and the development of SSR molecular [D]. Taiyuan: Shanxi Agriculture University, 2015 (in Chinese)
- [33] Lawson M J, Zhang L. Distinct patterns of SSR distribution in the *Arabidopsis thaliana* and rice genomes [J]. *Genome Biology*, 2006, 7(2): R14
- [34] Li D, Deng Z, Qin B, Liu X & Men Z. De novo assembly and characterization of bark transcriptome using Illumina sequencing and development of EST-SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell Arg) [J]. *BMC genomics*, 2012, 13(1), 192
- [35] 刘峰,王运生,田雪亮,茆振川,邹学校,谢丙炎. 辣椒转录组 SSR 挖掘及其多态性分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(1): 168-174
Liu F, Wang Y S, Tian X L, Mao Z C, Zou X X, Xie B Y. SSR mining in pepper (*Capsicum annuum* L) transcriptome and the polymorphism analysis [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39(1): 168-174 (in Chinese)